

Université de M'sila

Faculté des sciences

Département SNV

Intitulé du master : Biotechnologie végétale

Semestre : 01

Intitulé de l'UE : UE Méthodologie 1

Intitulé de matière : Techniques de valorisation des ressources végétales

Crédits : 4

Coefficients : 2

Enseignante : SAOUDI Ouarda

E-mail : ouarda.saoudi@univ-m'sila.dz

Objectifs de l'enseignement :

- Acquisition des connaissances nécessaires à la maîtrise des techniques de séparation, d'extraction et d'analyse des substances naturelles.

Références

- Chimie des substances odorantes (Teisseire) – Edition Lavoisier Tec et Doc
- Génie industriel alimentaire, Les procédés physiques de conservation, Ed. Lavoisier
- Génie industriel alimentaire tome 2 : Techniques séparatives, Edition Lavoisier Tec et Doc
- Identification spectrométrique de composés organiques, Ed. De Boeck Université
- La chimie analytique : mesure et société, Ed. Lavoisier Tec et Doc
- Le génie chimique à l'usage des chimistes, Edition Lavoisier Tec et Doc
- Biologie Cellulaire Et Moléculaire (Eduardo D. P, Robertis, E. M. F. De Robertis – 1983),
- Biologie moléculaire de la cellule(Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira – 2005)
- Principes des techniques de biologie moléculaire (Denis Tagu – 1999)

Evaluation des informations précédentes

Cochez-la ou les bonne(s) réponse(s) :

1- C'est une phase solide ou liquide qui est maintenue en place :

- La phase stationnaire
- La phase mobile
- L'élution

COURS2

TYPES DE LA CHROMATOGRAPHIE

1.1 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode populaire et couramment utilisée pour l'analyse des médicaments traditionnels à base de plantes, car elle est facile à utiliser et n'est pas limitée par la volatilité ou l'instabilité thermique des constituants des échantillons contrairement à la GC. Aussi plusieurs types de phase stationnaire sont utilisés et cette méthode chromatographique peut être associée à de nombreux détecteurs (UV, ELSD, CAD, IR-TF, MS et RMN) offrant ainsi beaucoup de possibilités pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques.

1.1.1 Principe de la séparation :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. À la sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

1.1.2 L'appareillage :

Les différentes composantes d'une HPLC sont présentées sur le schéma suivant. Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.

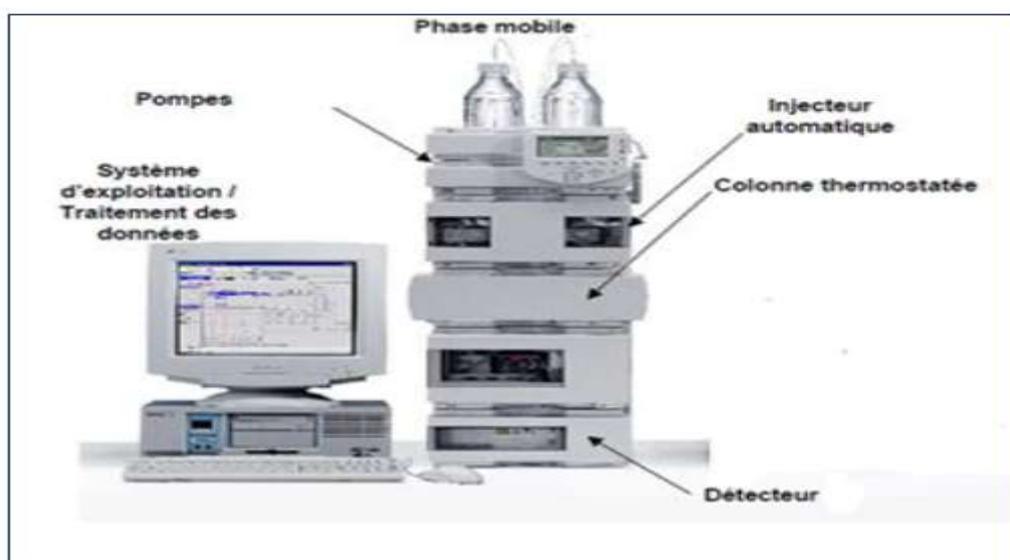


Figure 1 : Les organes d'une chaîne HPLC

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostaté), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).

1.1.2.1 Les réservoirs de phase mobile et le traitement du solvant :

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs façons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser de gradients d'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé.

1.1.2.2. Les dispositifs de pompage :

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler jusqu'à une pression de 400 bars, En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars.

La plupart des constructeurs ont équipé leurs systèmes de pompage de pompes à pistons avec un mouvement alternatif.

1.1.2.3 Les dispositifs d'injection de l'échantillon :

En CLHP, on injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère ; toutefois, cette procédure n'est pas très reproductible et reste limitée aux pressions inférieures à environ 100 bars. En injection à écoulement bloqué, on arrête momentanément le flux de solvant, on ouvre un ajustage au-dessus de la colonne et on y injecte directement l'échantillon à l'aide d'une seringue. La méthode d'introduction de loin la plus utilisée emploie des boucles d'échantillonnage. Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de CLHP moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillon compris entre 5 et 500 µl. Avec ce système, la reproductibilité des volumes injectés est de quelques dixièmes de pourcent.

1.1.2.4 Les colonnes :

Les colonnes de CLHP sont usuellement en acier inoxydable, quoiqu'on utilise parfois de tubes de verre à paroi épaisse dans le domaine des basses pressions (< 40 bars). La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des tailles particulières de 5 à 10 µm. Ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre. Depuis peu, existent de microcolonnes à haute performance qui ont un diamètre intérieur de 1 à 4,6 mm et une

longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes, qui sont remplies de particules de 3 à 5 μm , offrent jusqu'à 100000 plateaux par mètre et présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant. Cette dernière propriété est d'une importance considérable car les solvants de haute pureté requis pour la CLHP sont très coûteux. La colonne mesure 4 cm de long et a un diamètre intérieur de 4 mm ; elle est remplie de particule de 3 μm .

Le matériau de remplissage le plus courant employé en CLHP est de la silice, préparé en agglomérant des particules submicroniques de silice sous la forme d'agrégats plus gros, de diamètre extrêmement uniforme. Ces micrograins sont souvent recouverts d'un mince film organique qui est physiquement ou chimiquement lié à la surface. Parmi les autres matériaux utilisés, figurent des particules constituées d'alumine, de polymères poreux ou de résines échangeuses d'ions.

On place souvent une courte colonne de protection en amont de la colonne analytique afin d'en augmenter la durée de vie, en éliminant les poussières et les contaminants contenus dans les solvants. Dans le cas de la chromatographie liquide, la colonne de garde sert également à saturer la phase mobile avec une portion de la phase stationnaire afin de minimiser les pertes en phase stationnaire de la colonne analytique. La composition de la colonne de garde doit être semblable à celle de la colonne analytique ; toutefois, ses dimensions particulières sont usuellement plus grandes afin de minimiser la perte de charge.

1.1.2.5 Les détecteurs :

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), ceux qu'on a utilisés. Ils mesurent l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. On trouve aussi les détecteurs à barrette de diodes, la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité... etc. Les détecteurs absorptiométriques dans l'ultraviolet ou le visible et le réfractomètre différentiel sont les plus utilisés. Ces détecteurs sont les plus couramment utilisés en HPLC car ils sont peu sensibles aux fluctuations de débit et de température et un grand nombre de solvants ont une bonne transparence dans l'UV.

Un autre détecteur largement utilisé mesure la variation d'indice de réfraction du solvant due à la présence des molécules d'analyte. Contrairement à la plupart des autres détecteurs cités dans le tableau 3.1, le réfractomètre n'est pas sélectif et répond à tous les solutés ; sa sensibilité est par ailleurs quelque peu limitée. On peut également utiliser divers détecteurs électrochimiques qui effectuent des mesures potentiométriques, conductométriques ou voltampérométriques.

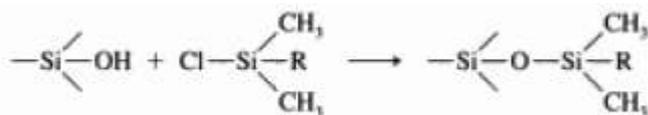
I.1.3 TYPES DE LA HPLC

I.1.3.1 La chromatographie de partage :

De toutes les méthodes de chromatographie en phase liquide, la plus utilisée est la chromatographie de partage qui peut être subdivisée en chromatographie liquide-liquide et liquide-phase greffée, la différence réside dans la manière dont on fixe la phase stationnaire sur les particules du support. Pour le partage liquide-liquide, il s'agit d'adsorption physique, alors que la phase greffée implique des liaisons covalentes. À l'origine, les chromatographies de partage étaient exclusivement du type liquide-liquide, alors qu'aujourd'hui ce sont les supports à phase greffée qui prédominent en raison de leur plus grande stabilité. Les séparations liquide-liquide ne sont plus réservées qu'à certaines applications particulières.

I.1.3.1.1 Support à phase greffée :

La plupart des supports à phase greffée sont préparés par la réaction d'un organochlorosilane avec les groupements –OH préalablement formés sur la surface de particules de silice par hydrolyse dans l'acide chlorhydrique dilué et chaud. Le produit obtenu est un organosiloxane. La réaction peut s'écrire.



Où R est usuellement un groupement n-octyle ou n-octadécyle. D'autres groupements fonctionnels organiques ont été greffés sur des surfaces de silice, notamment des amines aliphatiques, des éthers, des nitriles et des hydrocarbures aromatiques. On dispose ainsi de toute une gamme de polarités pour la phase stationnaire.

Les supports à phase greffée sont nettement plus stables que ceux où la phase stationnaire est retenue par simple imprégnation. Pour de tels supports, il faut régulièrement retraiter les surfaces solides parce que la phase stationnaire en est progressivement éliminée par la phase mobile. Pour cette même raison, la technique du gradient d'éluion ne peut pas y être appliquée. L'inconvénient majeur des supports à phase greffée consiste en ce que leur capacité est relativement limitée.

I.1.3.1.2 Supports à phase normale et à phase inversée :

On peut distinguer deux types de chromatographie de partage selon la polarité relative des phases mobiles et stationnaires. Les premiers travaux de chromatographie liquide utilisaient des phases stationnaires très polaires, telles que le triéthylène glycol ou l'eau ; un solvant relativement non polaire, tel que l'hexane ou l'éther i-propylique, servait de phase mobile. Pour des raisons historiques, ce type

de chromatographie est appelé actuellement chromatographie classique ou normale. En chromatographie en mode inversé, c'est la phase stationnaire qui est non polaire (souvent un hydrocarbure), et la phase mobile est un solvant relativement polaire. En chromatographie en mode normal, le constituant le moins polaire est élué le premier ; l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit donc son temps d'élution. Par contre, dans la méthode en mode inversé, le constituant le plus polaire est élué le premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile allonge son temps d'élution.

On estime que plus des trois quarts des séparations par CLHP s'effectuent actuellement sur des supports de silice greffée octyle ou octadécyle en mode inversé. Sur ces colonnes, les longues chaînes hydrocarbonées sont alignées parallèlement les unes aux autres et perpendiculairement à la surface des particules, ce qui produit une surface hydrocarbonée hérissée, non polaire. La phase mobile utilisée pour de tels supports est souvent une solution aqueuse contenant diverses concentrations d'autres solvants tels que le méthanol, l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane.

1.1.3.1.4 Choix des phases mobiles et stationnaires :

Pour être efficace, la chromatographie de partage requiert un équilibre judicieux entre les forces intermoléculaires qu'impliquent les trois acteurs du processus de séparation : l'analyte, la phase mobile et la phase stationnaire. Ces forces intermoléculaires peuvent être qualitativement classées en termes de polarité relative. En général, la polarité des groupements fonctionnels organiques usuels augmente dans l'ordre : hydrocarbures aliphatiques < oléfines < hydrocarbure aromatique < halogénures < sulfures < éthers < nitrodérivés < esters \approx aldéhydes \approx cétones < alcools \approx amines < sulfones < sulfoxydes < amides < acides carboxyliques < eau.

En règle générale, la plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle de l'analyte ; on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente. Cette procédure est généralement plus efficace que celle où les polarités de l'analyte et de la phase mobile sont voisines, mais différentes de celle de la phase stationnaire. Dans ce dernier cas, la phase stationnaire ne peut guère retenir l'analyte et les temps de rétention deviennent trop courts. A l'autre extrême, si les polarités de l'analyte et de la phase stationnaire sont trop voisines, les temps de rétention requis deviennent prohibitifs.

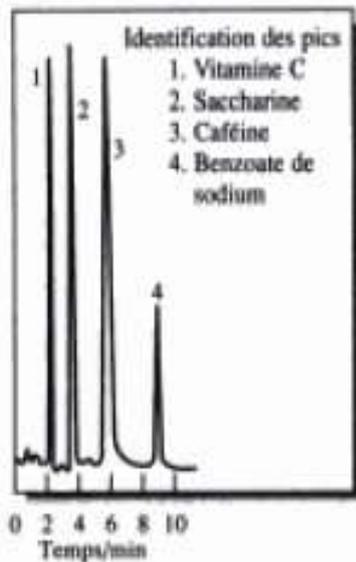


Figure 2 : Chromatographie liquide à phase greffée d'additifs de limonade.

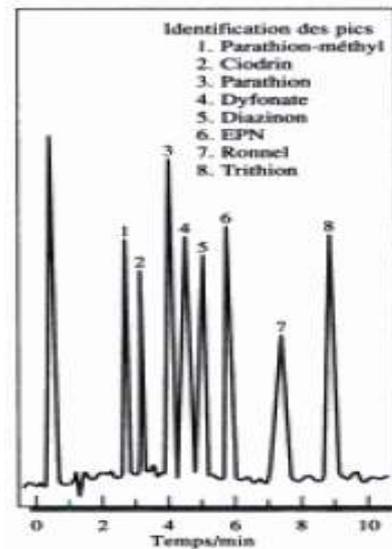


Figure 3 : Chromatographie liquide à phase greffée d'insecticides organophosphorés.

I.1.3.1.5 Applications de la CLHP de partage :

Le tableau 1 illustre la grande variété d'échantillons que cette technique permet d'étudier.

Domaine	Exemples de mélanges
Pharmaceutique	Antibiotique, sédatifs, stéroïde, analgésiques
Biochimique	Acide aminés, protéines, hydrates de carbone, lipides
Alimentaire	Edulcorant , antioxydants, aflatoxines, additives
Industrie chimique	Aromatique condensés, surfactants, combustibles pour fusée, colorants
Pollution	Pesticides, herbicides, phénols, PCB
Chimie légale	Médicaments, poisons, alcool dans le sang, stupéfiants
Analyse médicale	Acides biliaires, métabolites de médicaments, extraits d'urine, œstrogènes

I.1.3.2 La chromatographie d'adsorption :

La chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires solides finement divisées appelées adsorbants et pour cette raison, cette chromatographie est souvent synonyme de chromatographie liquide –solide. C'est la plus ancienne des méthodes chromatographiques (expérience de Tswett, 1903). Elle s'applique aussi bien à la séparation des composés présentant des

groupements fonctionnels différents qu'à celle d'isomères. Elle ne convient pas à la séparation de molécules très polaires souvent adsorbées de manière irréversible sur la phase stationnaire.

L'adsorption est mise à profit aussi bien en chromatographie d'élution qu'en chromatographie de développement.

La chromatographie d'adsorption se pratique soit sur couche mince, soit sur colonne, en phase liquide ou en phase gazeuse. Dans le cas de la chromatographie sur colonne, celle-ci (en verre ou en acier inoxydable) est remplie de particules solides, à des granulométries, porosités et activités adaptées au cas à résoudre. En couche mince régulière (0,25 à 2 mm, généralement).

Les adsorbants les plus largement employés sont l'hydroxylapatite, l'alumine ou le gel de silice (tableau 2). Ces phases doivent être activées avant la séparation, en les mettant à l'étuve pour enlever les molécules d'eau qui saturer les sites d'adsorption.

Tableau2 : Adsorbant couramment utilisés en chromatographie d'adsorption.

Carbonate de calcium
Sulfate de calcium
Hydroxylapatite (phosphate tricalcique)
Carbone de magnésium
Oxyde de calcium
Gel de silice
Charbonactive
Oxyde de magnésium
Alumine (oxyded'aluminium)

La phase mobile (éluant) est constituée par des mélanges de solvants organiques non aqueux de polarité variable. Ces derniers sont classés en séries héliotropes en fonction de leur capacité à désorber les molécules adsorbées sur un gel donné (tableau3). Quelques microlitres de la solution à analyser sont introduits au sommet de colonne. L'élution des molécules adsorbées se fait généralement par augmentation progressive de la polarité de la phase mobile. Au cours de cette élution par gradient, les composés qui ont l'affinité la plus faible avec la phase stationnaire apparaissent en premier dans l'éluant et ceux ayant l'affinité la plus forte en dernier.

Tableau 3 : Eluant utilisés comme phase mobile en chromatographie d'adsorption (classés par ordre de polarité croissante).

Hexane, heptanes
Cyclohexane
Tétrachlorure de carbone
Benzène
Toluène
Diéthylether
Chloroforme
Dichlorométhane
Acétated'éthyle
Butanol-1
Pyridine
<i>n</i> -Propanol
Ethanol
Méthanol
Eau
Acideorganique
Acides in organiques et bases

La chromatographie d'adsorption est principalement utilisée pour la séparation des substances polaires non ioniques ou des substances non polaires, tels que les lipides.

1.1.3.2.1 Applications :

La CLHP liquide-solide s'utilise surtout pour séparer des composés organiques relativement non polaires, insoluble dans l'eau, et dont les masses molaires sont inférieures à environ 5000. La chromatographie d'adsorption l'emporte sur les autres méthodes notamment par sa capacité à fractionner des mélanges d'isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para.

QUESTION :

Donnez le principe de la HPLC